



Cany

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/866, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/05394 (43) Date de publication internationale: 3 février 2000 (03.02.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01813</p> <p>(22) Date de dépôt international: 23 juillet 1999 (23.07.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/09457 24 juillet 1998 (24.07.98) FR 60/122,792 4 mars 1999 (04.03.99) US</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SARKIS, Chamsy [FR/FR]; 31 rue Bayen, F-75017 Paris (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18 rue Charcot, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LANCELOT, Géraldine; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: VECTORS DERIVED FROM BACULOVIRUS AND USE FOR TRANSFERRING NUCLEIC ACIDS INTO NERVE CELLS OF VERTEBRATES</p> <p>(54) Titre: VECTEURS DERIVES DE BACULOVIRUS ET UTILISATION POUR LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES DES VERTEBRES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns novel recombinant viruses and their use for gene-transfer into nerve cells of vertebrates. The invention also concerns pharmaceutical compositions comprising said recombinant viruses. More particularly, the invention concerns novel vectors derived from baculoviruses and their use for treating diseases of the nervous system of vertebrates.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne de nouveaux virus recombinants et leur utilisation pour le transfert de gènes dans les cellules du système nerveux des vertébrés. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement la présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des baculovirus et leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux des vertébrés.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

VECTEURS DERIVES DE BACULORIVUS ET UTILISATION POUR LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES DES VERTEBRES

L'invention concerne de nouveaux virus recombinants et leur utilisation pour

5 le transfert de gènes dans les cellules du système nerveux des vertébrés. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement la présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des baculovirus et leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux des vertébrés.

10 Les baculovirus sont des virus enveloppés à ADN bicaténaire circulaire spécifiques d'invertébrés. Leur prototype, AcNPV (*autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus), a un génome de 133 kb. Ce vecteur est très largement utilisé comme vecteur d'expression de gènes eucaryotes en cellules d'insectes, à partir de deux promoteurs forts [polyédrine (Ph) et P10], (King et Possee, *The baculovirus expression system*. London: Chapman&Hall, 1992.).

15 Des stocks de baculovirus peuvent être préparés par infection de cellules d'insectes (Sf9 ou Sf21) par le baculovirus recombinant. La production de protéine se fait par infection des cellules d'insecte avec le baculovirus: le milieu cellulaire est récolté et la protéine synthétisée *in vitro* dans les cellules d'insecte est extraite.

20 Les baculovirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue dans des cellules d'insectes (généralement Sf9 ou Sf21) entre le plasmide navette contenant le transgène sous contrôle d'un promoteur actif dans les cellules de vertébrés et le génome du baculovirus linéarisé au niveau du site de recombinaison, ou par d'autres techniques bien connues de l'homme du métier (transposons, recombinaison en levure...). Les baculovirus sont des virus épisomaux (chez l'insecte), et permettent d'y intégrer jusqu'à 100 kb d'ADN recombinant. Ainsi ils présentent de nombreux avantages liés à leur facilité de production (multiplication en cellules d'insectes, conditions de culture industrialisables, obtention de titres élevés), à leur capacité de clonage importante, et au fait qu'il présentent un faible risque de dissémination car ils

sont ni réplicatifs chez les mammifères ni disséminatifs chez les insectes. Ces vecteurs n'ont cependant pas été utilisés dans le domaine de la thérapie génique, car d'une part et jusqu'à très récemment il était admis que ces virus n'infectaient pas les cellules de mammifères, et d'autre part la transfection de Baculovirus *in vivo* chez les 5 mammifères n'a encore jamais été mise en évidence.

Hoffmann et al. (PNAS USA 92 (1995) 10099-10103) ont montré qu'un baculovirus recombinant contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur précoce de CMV est capable d'infecter et d'exprimer le transgène dans des hépatocytes avec une très bonne efficacité : humains (culture primaire, lignée Huh7 et 10 HepG2) et murins (culture primaire de lapin). Cependant ces auteurs n'ont pas observé d'expression significative du transgène dans toute une série de lignées provenant d'origines diverses, y compris du système nerveux (neuroblastome de souris Neuro-2a, astrocytome humain SW1088 et pheochromocytome de rat PC12).

Boyce F.M. et Bucher N.L.R. PNAS USA 93 2348-2352 (1996) ont obtenu 15 une expression significative du gène LacZ placé sous contrôle d'un promoteur RSV dans la lignée HepG2 ainsi que dans les lignées 293 (rein humain), A549 (poumon humain) et PC12 (pheochromocytome de rat). Ils n'ont pas obtenu d'expression significative dans toutes les autres lignées testées,

Sandig V. et al. (Human Gene therapy 7 1937-1945 (1996)) ont utilisé un 20 baculovirus recombinant RSV-LacZ pour l'infection d'hepatocytes humains et murins. Ils ont montré que le virus est sensible au complément et ne peut donc pas infecter *in vivo* le foie. Ils ont obtenu cependant une infection d'un morceau de foie humain perfusé *ex vivo* par le baculovirus, après élimination du sérum.

Plus récemment, Shoji et al. (J. Gen. Virol. 1997) ont utilisé un baculovirus 25 recombinant contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur CAG (enhancer précoce du CMV et promoteur de la β -actine de poulet), et ont obtenu une expression significative dans différentes lignées cellulaires (HepG2, Huh7, CPK,

Cos7, Hela, FS-L3 KATO-III). Une faible expression a été détectée dans les lignées RGM-1, PC12, IMR-32 et MT-2.

5 Barsoum et al (Human Gene Therapy, § 2011-2018 (1997)) ont montré qu'il était possible de modifier l'enveloppe virale d'un baculovirus contenant une cassette d'expression de la β -galactosidase sous contrôle du LTR de RSV. Ceci permet d'améliorer le potentiel de transduction de ces vecteurs, en améliorant l'infection des cellules infectables par le baculovirus dont l'enveloppe n'est pas modifiée. Ceci permet également d'infecter des cellules qui n'étaient pas infectables par le baculovirus dont l'enveloppe n'était pas modifiée. Cependant, les auteurs n'ont pas 10 testé l'infection de cellules nerveuses. De plus, ils n'ont pas réussi à transduire les cellules Neuro2a (ou N2a) qui sont issues d'un neuroblastome de souris.

Ainsi jusqu'à présent aucun vecteur baculovirus n'a été utilisé pour le transfert de gènes *in vitro* ou *in vivo* dans les cellules du tissus nerveux. En effet, seule la lignée PC12, pouvant présenter dans des conditions particulières un phénotype 15 "pseudo-neuronal" (phechromocytome de rat : système nerveux périphérique), s'est révélée pouvoir être infectée par le baculovirus, cependant le niveau d'expression restait très faiblement supérieur à celui du contrôle. Enfin, aucune utilisation du baculovirus pour le transfert de gène *in vivo* chez les mammifères n'a été décrite jusqu'à présent.

20 La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant préférentiellement pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux, d'administrer ces baculovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée du 25 transgène *in vivo*, et en particulier dans le système nerveux. En effet, les résultats présentés dans les exemples démontrent que les baculovirus de l'invention peuvent infecter et diriger l'expression de transgène dans les cellules du système nerveux de vertébrés et préférentiellement de l'humain. A titre illustratif de l'invention, les

exemples de la présentent demande, rapportent de manière surprenante l'expression d'un transgène d'intérêt dans au moins 60 % de cellules d'une culture primaire de télencéphale humain différenciées et/ou une expression dans au moins 30 % de cellules télencéphaliques progénitrices ainsi que 30% d'astrocytes d'une culture primaire d'un cortex humain adulte. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de transgènes d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans le système nerveux ou pour une application *ex vivo* pour le transfert de gènes dans des cultures de cellules du système nerveux ou autre (cellules de Sertoli, cellules musculaires...) destinées à être greffées. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives ou le traitement de maladies métaboliques nécessitant un traitement spécifique du système nerveux en raison de la faible accessibilité des agents thérapeutiques qui ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique.

15 Un premier objet de l'invention réside dans des baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.

En particulier, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques.

20 Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

25 Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer

ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la 5 cellule lui permettant de lutter contre une pathologie, ou encore inhiber l'expression d'une protéine dans les cellules, par l'utilisation de mutants négatifs par exemple.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de 10 neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, en particulier neurotrophiques pour le traitement des maladies neurodégénératives, des traumatismes ayant endommagé le système nerveux, ou des dégénérescences rétiennes. Par exemple les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6 et leurs dérivés, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF et 15 leurs dérivés, l'IL6 , la cardiotrophine , le GDNF et ses dérivés, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IFGF-2 , les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 leurs dérivés, et le TGF- β .

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut également citer les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc 20 (FR 93 04745) , les gènes suicides : thymidine kinase, cytosine désaminase, etc.,

Les séquences d'acides nucléiques codant pour des produits d'intérêt thérapeutique au sens de la présente invention recouvrent également les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres constituants de la cellule.

25 On peut ainsi citer de manière non limitative les gènes associés aux maladies du métabolisme des carbohydrates comme par exemple fructose-1-phosphate aldolase, fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase, α -1,4-glucosidase lysosomale, amylo-1,6-glucosidase, amylo-(1,4 :1,6)-transglucosidase, phosphorylase musculaire,

phosphofructokinase musculaire, phosphorylase- β -kinase, galactose-1-phosphate uridyl transférase, toutes les enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, 2-oxoglutarate glyoxylase carboxylase, D-glycérate déshydrogénase.

5 On peut également citer :

- les gènes associés avec des maladies du métabolisme des amino-acides comme par exemple phénylalanine hydroxylase, dihydrobioptérine synthétase, tyrosine aminotransférase, tyrosinase, histidinase, fumarylacéto-acétase, glutathion synthétase, γ -glutamylcystéine synthétase, ornithine- δ -aminotransférase, carbamoylphosphate synthétase, ornithine carbamoyltransférase, argininosuccinate synthétase, argininosuccinate lyase, arginase, L-lysine déshydrogénase, L-lysine kétoglutarate réductase, valine transaminase, leucine isoleucine transaminase, décarboxylase des 2-céto-acides à chaîne ramifiée, isovaléryl-CoA déshydrogénase, acyl-CoA déshydrogénase, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase, acétoacétyl-CoA 3-kétothiolase, propionyl-CoA carboxylase, méthylmalonyl-CoA mutase, ATP:cobalamine adénosyltransférase, dihydrofolate réductase, méthylène tétrahydrofolate réductase, cystathionine β -synthétase, le complexe sarcosine déshydrogénase, les protéines appartenant au système de clivage de la glycine, β -alanine transaminase, carnosinase sérique, homocarnosinase cérébrale.
- 10 20 - Les gènes associés avec des maladies du métabolisme des graisses et des acides gras, comme par exemple lipoprotéine lipase, apolipoprotéine C-II, apolipoprotéine E, d'autres apolipoprotéines, lécithine cholestérolacyltransférase, récepteur des LDL, stérol hydroxylase du foie, « acide phytanique » α -hydroxylase.
- 15 25 - Les gènes associés avec des déficiences lysosomales, comme par exemple α -L-iduronidase lysosomale, iduronate sulfatase lysosomale, héparan N-sulfatase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosaminidase lysosomale, acétyl-CoA : α -glucosamine N-acétyltransférase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosamine 6-sulfatase lysosomale, galactosamine 6-sulfate sulfatase lysosomale, β -galactosidase lysosomale,

arylsulfatase B lysosomale, β -glucuronidase lysosomale, N-acétylglucosaminyl-phosphotransférase, α -D-mannosidase lysosomale, α -neuraminidase lysosomale, aspartylglycosaminidase lysosomale, α -L-fucosidase lysosomale, lipase acide lysosomale, céramidase acide lysosomale, sphingomyelinase lysosomale, 5 glucocérébrosidase lysosomale et galactocérébrosidase lysosomale, galactosylcéramidase lysosomale, arylsulfatase A lysosomale, α -galactosidase A, β -galactosidase acide lysosomale, chaîne α de l'hexosaminidase A lysosomale.

On peut également citer, de façon non restrictive, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des stéroïdes et des lipides, les gènes associés avec des 10 maladies du métabolisme des purines et des pyrimidines, ainsi que les gènes associés à des maladies du métabolisme de la porphyrine et de l'hème.

La séquence d'acides nucléiques hétérologue peut être un gène ou une 15 séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrtes, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308, en ARN autocatalytiques tels que les ribozymes ainsi qu'en ARN modifiant l'épissage en trans.

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend 20 également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée. Il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir 25 de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. Avantageusement, il s'agit d'un promoteur actif dans les cellules ou tissus nerveux, notamment d'un promoteur eucaryote. A cet égard, il peut s'agir par exemple d'un

promoteur ubiquitaire, c'est-à-dire fonctionnel dans la majorité des types cellulaires. Encore plus préférentiellement, il s'agit donc d'un promoteur ubiquitaire eucaryote. Le promoteur peut être autologue, c'est-à-dire provenant de la même espèce que la cellule dans laquelle l'expression est recherchée ou xénogénique (provenant d'une autre espèce). On peut citer à titre d'exemples avantageux des promoteurs ubiquitaires eucaryotes des promoteurs forts tels que le promoteur du gène de la phosphoglycerate kinase 1 (PGK) ou d'autres promoteurs dirigeant l'expression des gènes du métabolisme cellulaire obligatoire (ces gènes sont dits "domestiques" ou "de ménage" et spécifient des protéines nécessaires à des fonctions communes à toutes les cellules).

Il s'agit par exemple de gènes intervenant dans le cycle de Krebs, dans la respiration cellulaire ou encore dans la réplication ou la transcription ou la traduction (EF1- α). On peut citer comme exemples particuliers de ce type de promoteurs, le promoteur des gènes α 1-antitrypsine, β -actine, vimentine, aldolase A ou Efl α (facteur d'elongation).

Le promoteur utilisé dans le cadre de l'invention peut encore être un promoteur eucaryote spécifique des cellules nerveuses. On peut citer à titre d'exemple le promoteur des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et, plus généralement, tous les promoteurs des enzymes de synthèse ou des transporteurs des neuromédiateurs ou tout autre promoteur de gènes dont l'expression est spécifique d'un type ou sous-type neuronal ou glial donné.

On peut également envisager l'utilisation de promoteurs viraux, tels que par exemple les promoteurs CMV (Cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), TK (Thymidine Kinase), SV40 (Simian Virus) et LTR (Long Terminal Repeat) de RSV, de MLV (Murine Leukaemia Virus) ou de HIV (Human Immunodeficiency Virus).

Il est également envisageable d'utiliser des promoteurs chimériques tels que CAG (enhancer de CMV et promoteur de la β -actine de poulet), NRSE-PGK ou des promoteurs inductibles tels que les promoteurs inductibles par la tétracycline (Tet-On et Tet-Off), les promoteurs inductibles à l'ecdysone, ou encore d'autres promoteurs 5 inductibles (RU486, 17 β -Oestradiol...) et notamment des promoteurs inductibles par le stress, tel que le stress thermique (hsp70)

En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

10 Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible ou dans un compartiment spécifique de la cellule. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une 15 séquence signal artificielle.

Le virus peut être utilisé aussi bien dans une approche *ex vivo* ou *in vivo*. Dans le cadre d'une thérapie génique applicable à l'homme, on peut envisager une approche *ex vivo* par greffe de cellules modifiées génétiquement par un baculovirus recombinant. Ces cellules peuvent être d'origines diverses: nerveuses (humaines ou 20 non humaines), cellules de Sertoli, cellules chromaffines..... L'association de certains médicaments peut être envisagée en vue notamment de d'améliorer le maintien de la greffe ou l'expression du transgène (immunosuppresseurs, anti-complément...). On peut aussi envisager l'implantation de cellules génétiquement modifiées par un baculovirus recombinant après encapsidation dans un système inerte.

25 Les baculovirus selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les cellules Sf9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode

décrise par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA). Ensuite les baculovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire comme illustré dans les exemples.

5 Les baculovirus de l'invention s'étendent à tout dérivé d'un baculovirus tel que décrit et produit précédemment. Par dérivé, il faut entendre tout baculovirus ayant son génome modifié soit par insertion de séquences soit par délétion de gènes viraux dans ledit génome. En particulier, les dérivés des baculovirus sont obtenus par délétion de tout ou partie d'un ou plusieurs gènes viraux. A titre d'exemple, on peut citer la 10 délétion du gène de la polyhedrine, du gène P10 ainsi que de tout gène non indispensable pour la réplication du baculovirus en cellules d'insecte notamment. Un dérivé particulier est représenté par la délétion de tous les gènes viraux du baculovirus (virus gutless) permettant l'insertion d'une cassette d'expression de grande taille.

Il est également possible de modifier l'enveloppe des baculovirus, c'est-à-dire 15 de faire exprimer une protéine d'enveloppe autre que celles des baculovirus à la surface de ceux-ci, permettant ainsi de modifier le spectre d'hôte du virus. On peut ainsi utiliser des enveloppes qui permettent d'élargir le spectre d'hôtes à une très large variété de types cellulaires ou l'on peut au contraire envisager de restreindre le spectre d'hôtes à un type spécifique de cellules nerveuses. Parmi les protéines d'enveloppe 20 utilisables on peut citer notamment : la glycoprotéine de VSV, la protéine d'enveloppe amphotrope de MLV. On peut également utiliser des protéines d'enveloppes qui permettent d'améliorer spécifiquement l'entrée du virus dans les cellules neurales (CNS et/ou PNS) telles que la glycoprotéine de rhabdovirus et notamment du virus de la rage, la glycoprotéine d'enveloppe de togavirus (alphavirus 25 dont Semliki Forest et Sindbis virus, et rubivirus) et notamment de la rubéole (rubivirus), la glycoprotéine des Herpès virus (HSV), ou tout autre virus neurotrope. Des variantes préférés de baculovirus recombinants selon l'invention sont des baculovirus pseudotypés par la glycoprotéine du virus de la rage (Rabies Virus) ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).

Ces vecteurs recombinants peuvent être utilisés pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules des tissus nerveux *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

L'application *in vivo* pourra être faite notamment par injection stéréotaxique du baculovirus recombinant dans le système nerveux central (cerveau, moelle) et 5 notamment dans le parenchyme ou bien dans les espaces contenant le liquide céphalorachidien (intraventriculaire ou intrathécal par exemple). A cet égard, il est possible d'utiliser l'association d'inhibiteurs du complément (CVF, sCR1(Hoffman et al., Gene therapy, 1998, vol.5, pp531-536), FUT175...) pour améliorer l'efficacité de la transfection. Il est également envisageable de réaliser l'administration du baculovirus, 10 notamment au niveau du muscle, afin d'atteindre le système nerveux par transport rétrograde du baculovirus et/ou du produit thérapeutique. Dans ce dernier cas, l'injection sera avantageusement précédée par une inhibition du système du complément *in vivo*.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute 15 utilisation d'un baculovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies du système nerveux. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces baculovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie 20 d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie de la sclérose en plaque ou d'autres maladies affectant la myelinisation, ainsi que les maladies affectant le métabolisme telles que les maladies lysosomiales et notamment la maladie MPS VII ou syndrome de Sly.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique 25 comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par différentes voies et notamment par voie intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intra-cérébrale, intra-ventriculaire, intra-médullaire, etc.

De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment

5 lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique.

10 L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies du système nerveux, telles que par exemple les maladies neurodégénératives ou métaboliques, comprenant l'administration à un patient d'un baculovirus

15 recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives et/ou lysosomiales comprenant l'administration stéréotaxique d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction

20 de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les baculovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond

25 au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire d'insecte, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées ou bien en titration par dilution limite. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules nerveuses humaines infectée par ces baculovirus. Il peut s'agir en particulier de cellules gliales 5 (astrocytaire, microgliale, oligodendrocyte, cellule de Schwann), épendymales, neurales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus 10 particulièrement de greffes autologues, il peut s'agir de cellules astrocytaires de préférence humaines adultes .S'agissant des greffes hétérologues, il peut s'agir de cellules embryonnaires de préférence humaines, de cellules progénitrices nerveuses ou neuronales telles que les progéniteurs issus de télencéphale ou de mésencéphale humain pouvant éventuellement différencier *in vitro* avant la greffe, des astrocytes 15 embryonnaires ; ces cellules peuvent être aisément obtenues à partir de biopsies. Il peut s'agir également de xénogreffes issues de phéochromocytomes, ou de cellules embryonnaires ou d'astrocytes ou encore d'autres types cellulaires tels que les cellules de Sertoli. Les cellules peuvent également être des cellules ES (Embryonic Stem cells) de préférence humaines, différencier dans une voie nerveuses par exemple. 20 Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les baculovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des baculovirus 25 recombinants, pour leur conférer la capacité de produire une substance d'intérêt thérapeutique. L'infection est réalisée *in vitro* selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien

entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration *in vivo*. Les doses de baculovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-5 avant pour l'administration *in vivo* peuvent être appliquées à l'infection *in vitro*.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^4 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en 10 comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de 15 gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le 20 cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-dessus, les compositions selon l'invention comprennent 25 avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non

toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée dans un muscle, une 5 tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête 10 définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies du système nerveux. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS, ou 15 encore les maladies lysosomiales. Les baculovirus selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur faible immunogénicité, en raison de l'absence d'expression des protéines du baculovirus dans les cellules de mammifères.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui 20 suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

MATERIELS ET METHODES

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en 25 gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

5 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

10 15 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

20 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

25 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

LEGENDE DES FIGURES

5 Figure 1 : Pourcentage de cellules GFP positives et conservées à l'état indifférencié par ajout de bFGF dans le milieu, en fonction de la quantité de baculovirus Bac-CMV-GFP (1 μ l correspondant à une MOI de 5).

10 Figure 2 : Pourcentage de cellules GFP positives et cultivées en présence de 10 % de sérum (état différentié), en fonction de la quantité de baculovirus Bac-CMV-GFP (1 μ l correspondant à une MOI de 5).

Figure 3 : Comparaison et mise en évidence de l'action du butyrate dans plusieurs lignées cellulaires : CHP-212, Hela, Cos 7. L'infection et l'expression est très significative notamment dans les cellules CHP-212. L'ajout de butyrate permet une expression de GFP dans pratiquement 100% de ces cellules.

15 Figure 4 : Mise en évidence de l'action du butyrate sur l'infection de cellules progénitrices cultivées en présence de 10 % de SFV 48 heures après l'infection :

4A : action du butyrate exprimée en pourcentage de cellules GFP positives. 48 heures après l'infection, plus de 60 % des cellules expriment la GFP.

20 - 4B : action du butyrate exprimée en intensité de fluorescence. 48 heures après l'infection, l'intensité de fluorescence est très supérieure, dans les cellules soumises à l'action du butyrate (intensité d'environ 425 avec butyrate versus une intensité égale à 100 sans butyrate).

Figure 5 : Résultats de l'expression *in vitro* de GFP après infection par Bac-CMV-GFP d'une culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines :

- 5A : culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines avec 10 % de SVF. La très grande majorité de ces cellules sont des astrocytes.
- 5B : culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines avec 10 % de SVF et butyrate. Toutes les cellules expriment la GFP.

5 Figure 6 : Résultats de l'expression de la GFP *in vivo* une semaine après injection stéréotaxique chez la souris Balb C du baculovirus bac-CMV-GFP :

- 6A : expression de la GFP dans le striatum. Morphologiquement, les cellules marquées semblent être des cellules épithéliales de vaisseau sanguin ainsi que quelques cellules nerveuses (astrocytes) entourant le vaisseau sanguin.
- 10 - 6B : expression de la GFP dans le striatum. Les cellules marquées sont des astrocytes.
- 6C : expression de la GFP dans le ventricule latéral. Les cellules marquées sont des cellules épendymaires.

15 Figure 7 : Résultats dans le striatum de l'expression de la GFP *in vivo* 48 heures après injection stéréotaxique chez le rat, du baculovirus bac-CMV-GFP . L'injection a été réalisée dans les mêmes conditions que décrites dans l'exemple4 (9 μ l de virus dilué à 1:10). Le marquage de l'expression de la GFP a été réalisé au moyen d'un anticorps anti-GFP (Clontech).

EXEMPLES

20

Exemple 1 : construction de différents vecteurs baculovirus

1.1 - Construction et production du Baculovirus RSV-LacZ:

Le baculovirus recombinant RSV-LacZ a été obtenu par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les

cellules Sf9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode décrite par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA).

Le plasmide navette a été élaboré par insertion dans le plasmide pVL1392 5 (Pharmingen, San Diego, CA) d'une cassette d'expression du gène de la *beta*-galactosidase nucléaire sous contrôle du LTR de RSV, et du signal de polyadénylation de SV40 en aval du gène LacZ. Cette cassette d'expression a été insérée dans le site multiple de clonage en orientation inverse par rapport au promoteur de la polyhédrine contenu dans le plasmide pVL1392.

10 Le virus est ensuite produit par amplification dans des cellules Sf9. Il est concentré par ultracentrifugation de 180 ml de surnageant (titré initialement à 3×10^7 pfu/ml) à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes dans un rotor SW 28, puis repris dans 2ml de PBS, ultracentrifugé à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes dans un rotor SW 41 dans un gradient de saccharose (10% à 60%, en PBS). La bande blanche 15 correspondant aux particules virales purifiées est prélevée et resuspendue dans du PBS et ultracentrifugée à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes. Le culot est resuspendu dans 1,5 ml de PBS froid. Ce stock de virus concentré et purifié est conservé à 4°C ou à -80 ° C.

1.2 - Construction et production du Baculovirus CAG-LacZ:

20 Le baculovirus recombinant CAG-LacZ a été obtenu en utilisant le plasmide navette pAcYM1 (Matsuura et al, J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250). Une cassette d'expression contenant le promoteur CAG contrôlant l'expression du gène LacZ a été insérée dans le plasmide navette. Le promoteur CAG est un promoteur composite consistant en un enhancer CMV IE, le promoteur de la *beta*-actine de poulet et le signal de polyadénylation de la *beta*-globine de lapin.

Le baculovirus recombinant a été obtenu par recombinaison homologue dans les cellules Sf9, puis amplifié dans ces cellules (selon le protocole de Matsuura et al., J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250).

Le virus utilisé a été obtenu par amplification d'un aliquot du baculovirus 5 recombinant dans les cellules Sf9. La solution virale est titrée à 1×10^9 pfu/ml. Le virus est ensuite concentré d'un facteur 100 et purifié dans les mêmes conditions que celles décrites pour le baculovirus RSV-LacZ.

1.3 Construction et production du Baculovirus CMV-GFP

Cet exemple a pour but de décrire la construction d'un baculovirus 10 recombinant, véhiculant une cassette d'expression très active, clonée à partir du vecteur pCI vector (Promega) et incluant le gene de la Green Fluorescent Protein (EGFP), clonée à partir du plasmide EGFP (Clontech), sous contrôle d'un promoteur CMV et un intron chimérique (comprenant le site d'épissage 5' de l'intron de la β -globine et le site 3' d'épissage d'un intron IgG par exemple) placé en amont du 15 transgène et un polyA de SV 40.

Tout d'abord, un plasmide navette Bac-CMV contenant une cassette d'expression comprenant le promoteur précoce du CMV, le signal tardif de polyadénylation de SV40 et un site multiple de clonage a été construit afin de pouvoir cloner tout ADNc pour l'expression de ce dernier en cellules de mammifères. 20 Initialement, la cassette a été clonée dans un vecteur pVL1392 (Invitrogen), en orientation inverse du promoteur de la polyhedrine afin de prévenir toute interférence de transcription avec la promoteur de la polyhedrine du baculovirus. Le gène reporter GFP a été cloné dans le plasmide navette (Bac-CMV) pour produire le plasmide Bac-CMV-GFP.

25 Ce plasmide navette a ensuite été transfété en cellules d'insecte Sf9 pour la production des baculovirus recombinants, par recombinaison homologue avec le génome linéarisé de *Autographa californica* (AcNPV). Lorsque le virus a été amplifié

sur cellules d'insecte Sf9, l'expression de la GFP a pu être détectée en microscopie de fluorescence, démontrant ainsi que le promoteur CMV était actif dans ces cellules.

Après amplification, le stock viral (Bac. CMV-GFP) a été successivement concentré et purifié selon les méthodes décrites précédemment. Les aliquots ont été 5 conservés à - 80 ° C.

Exemple 2 : test de l'infection *in vitro* de différentes cultures cellulaires par le baculovirus RSV-LacZ

2.1 - Infection des cultures primaires d'astrocytes adultes:

Les cellules sont cultivées dans des boites de 4 trous. L'infection se fait à 37°C 10 dans du milieu de culture sans sérum pendant 2 h environ. Elle a été faite avec des concentrations croissantes de virus recombinant. Après 24 h les cellules sont fixées (PFA 4%) et colorées par du X-Gal. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellule bleue.

L'observation des cultures à 24 et 48 heures après l'infection montre que le 15 baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules d'une culture primaire d'astrocytes humains (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

2.2 - Infection des cultures primaires de télencéphale embryonnaire humain:

Les cellules sont cultivées en milieu contenant du bFGF (milieu permettant de 20 les maintenir dans un état de cellules progénitrices non ou très peu différenciées). L'infection a été faite dans le milieu de culture complet pendant 2 h. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellules bleues.

L'observation des cultures quatre jours après l'infection montre que le 25 baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules progénitrices nerveuses

humaines (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

5 L'ensemble de ces résultats démontrent que les vecteurs recombinants dérivés des baculovirus sont capables d'infecter différents types de cultures primaires de cellules neurales *in vitro* et peuvent être ainsi utilisés comme vecteur de thérapie génique pour le transfert de gènes *ex vivo*.

Exemple 3 : test de l'infection *in vitro* de différentes cultures cellulaires par le baculovirus Bac-CMV-GFP

3.1 infection de différentes lignées cellulaires

10 Afin d'apprécier l'efficacité du vecteur Bac-CMV-GFP pour le transfert de gène dans les cellules de mammifères, l'activité potentielle de ce vecteur à infecter et à diriger l'expression du gène reporter GFP dans différentes lignées neuronales (CHP212) et non neuronale (HuH7, 293, HeLa, Cos7) a été étudiée. Pour cela, les lignées de cellules HuH7 (hépatocytes humains), 293 (reins humains), HeLa (épithélium humain), Cos7 (rein de singe), N2A (cellules de neuroblastome murin) et CHP212 (cellules de neuroblastome humain) ont été infectées par ce vecteur à une MOI de 12,5. A cette concentration de vecteur, l'analyse des cellules fluorescentes par cytométrie de flux, permet de constater que près de 100 % des cellules HuH7 et 293 sont transduites, ainsi qu'une forte proportion des cellules CHP212 et dans une moindre mesure des cellules HeLa, Cos7 et N2A (de l'ordre de 5 à 20 %).

15 Afin de documenter les phénomènes de repression transcriptionnelle de ses vecteurs, les cellules transduites ont été traitées par un inhibiteur des déacétylases des histones (butyrate). En effet, cet agent est décrit comme un puissant facteur capable de lever les inhibitions de la transcription dues à la condensation de la chromatine. Ainsi, dans 20 chaque cas, une augmentation significative du nombre de cellules exprimant le transgène a pu être montrée. De la même manière, une forte augmentation de la quantité de fluorescence par cellules après induction au butyrate a été enregistrée.

Ces expériences montrent la capacité de ce vecteur à transduire efficacement un large éventail de cellules de mammifères. En outre, il a été observé que ce vecteur permet de transduire très efficacement une lignée neuronale humaine (CHP212).

3.2 Infection de cultures primaires de cellules nerveuses *in vitro*

5 De la même façon que pour les lignées cellulaires, le vecteur Bac-CMV-GFP a été utilisé pour transduire des cellules nerveuses primaires de rongeur ou humaines.

Initialement des cellules progénitrices neuroépithéliales primaires humaines ont été infectées et cultivées en milieu contenant du bFGF (état progéniteur) ou bien cultivées en présence de serum (cellules différenciées majoritairement dans la voie gliale), avec 10 une gamme croissante de vecteur jusqu'à une quantité correspondant à une MOI de 25. Deux jours après l'infection, l'analyse par cytométrie de flux révèle la présence de l'ordre de 30 % de cellules progénitrice-bFGF et de l'ordre de 60 % de cellules progéniteurs différenciés, exprimant la GFP comme le montrent respectivement les figures 1 et 2. Il est intéressant de remarqué que la courbe dose/réponse dans le cas 15 des cellules progénitrices n'a pas atteint de plateau à une MOI de 25, suggérant que ces cellules peuvent être infectées de manière plus importante.

Par ailleurs, des expériences de double marquage *in vitro* sur les cellules humaines du télencéphale embryonnaire à l'aide des marqueurs GFAP (marqueur des astrocytes) et MAP 5 (marqueurs des neurones) montrent nettement que ces deux types cellulaires 20 sont infectables. En effet, les résultats fournissent un marquage GFAP/GFP et MAP5/GFP démontrant de manière inattendue que non seulement les astrocytes mais également les neurones sont infectés.

En parallèle, sur les mêmes cellules il a été vérifié que le taux de "pseudotransduction" c'est-à-dire que le nombre de cellules GFP+ qui n'ont synthétisé 25 de novo de nouvelles du gène reporter était dans tous les cas inférieur à 3 % des cellules GFP positives. Pour cela, la présence d'une fluorescence a été recherchée, trois heures après l'infection, durée qui ne permet pas une expression effective de la

GFP suivant le mécanisme de transcription et traduction du gène de la GFP (figures 4Aet 4B). De plus, l'inactivation des virus par irradiation aux UV (avec un UV-cross-linker à une dose de 100 000 µjoules environ) avant l'infection a permis de montrer qu'il n'y avait quasiment plus (moins de 3%) de cellules GFP positives, confirmant donc les résultats obtenus en pseudotransduction.

L'effet du butyrate a été également évalué sur des cellules gliales obtenues par différenciation de cultures de progéniteurs nerveux humains, infectés par Bac-CMV-GFP. Vingt-quatre heures après supplémentation de l'inducteur dans le milieu de culture, un doublement du nombre de cellules GFP positives par rapport aux cellules non traitées a été observé. La valeur moyenne de fluorescence dans les cellules traitées, était cependant, environ quatre fois supérieur à celle observée dans les cellules non traitées. Ces données suggèrent fortement un mécanisme épigénétique de repression transcriptionnelle de la même manière que décrit précédemment pour les lignées cellulaires. Ces résultats montrent en outre que le vecteur de l'invention permet d'infecter des astrocytes primaires humains adultes, ainsi que des pinéalocytes primaire de rat.

Cet exemple démontre donc qu'un baculovirus contenant une cassette d'expression comprenant un promoter (CMV) et un gène hétérologue (GFP) est capable d'infecter des cellules non neuronales mais également et de manière surprenante, des cellules neuronales (lignée CHP212) ainsi que des cellules nerveuses issues de cultures primaires (embryonaires ou adultes) et de diriger l'expression du gène hétérologue dans lesdites cellules à un taux très significatif.

Exemple 4 : Test *in vivo* avec le baculovirus RSV-LacZ

4.1 - Injection stéréotaxique dans le striatum de rat:

Des rats femelles adultes Sprague-Dowley ont été injectées avec 9 µl de virus RSV-LacZ concentré. L'injection a été faite par injection lente de 1 µl de virus (0,25 µl/min) dans trois sites d'injections avec 3 sous-sites pour chacun des sites.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma :

A: +1,8 , L: + 2,5 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: +0,6 , L: + 3,2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: + 0,6 , L: +2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

5 5 jours après l'infection, les rats sont fixés par perfusion intracardiale de PFA 4% en PBS et les cerveaux post-fixés pendant 24 h à 4°C dans du PFA 4%. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés par immersion dans du saccharose 15% dans du PBS pendant 72h. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane froid (-50°C) et préservés à - 80°C.

10 4.2 - Histologie sur les cerveaux des rats injectés:

Les cerveaux sont coupés au niveau du striatum au cryostat (épaisseur de coupe: 20 μ m). Les coupes sont étudiées en immunohistochimie pour détecter la présence de β -galactosidase d'*E. coli*. Les lames sont lavées en PBS, incubées en méthanol + H₂O₂ 0,3% pendant 1 heure, lavées en PBS, puis préincubées pendant 2 h 15 avec du PBS + 10% SVF + 0,1% de Triton. Ensuite elles sont incubées toute la nuit avec de l'anticorps anti- β -Gal (Cappel: 1:5000ème), lavées avec du PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire (Kit Vectastain Goat Anti-Rabbit). La révélation est faite en DAB + Nickel. Ainsi un grand nombre de cellules marquées a été observé dans les deux cerveaux (sur environ 100 coupes, faisant une épaisseur d'environ 2 mm 20 autour du point d'injection).

Un double-marquage fluorescent β -Gal + GFAP a été fait en utilisant un anticorps monoclonal anti- β -Gal (Promega) et un anticorps anti-GFAP polyclonal. Très peu de cellules sont doublement marquées.

On observe une transduction et un marquage plus prononcé des cellules à la 25 périphérie du corps calleux ainsi que cellules dans le striatum.

L'étude par immunohistochimie avec l'anticorps anti- β Gal démontre que le baculovirus recombinant permet l'infection et l'expression du transgène dans un grand

nombre de cellules nerveuses. Elle montre aussi que le baculovirus recombinant n'est pas inactivé par le complément dans le CNS.

Exemple 5 : test in vivo avec le baculovirus Bac-CMV-GFP

Cet exemple a pour but de démontrer la capacité du vecteur Bac CMV-GFP à infecter 5 des cellules nerveuses in vivo.

Le vecteur Bac-CMV-GFP à 10^6 pfu a été injecté dans le striatum de rat Sprague Dawley adultes et de souris Nude ou Balb-C adultes. Les coordonées stéréotaxiques d'injection sont les suivantes :

10 - Pour les rats (femelles adultes Sprague Dawley, 200-250g) : injection de 9 μ l à raison de 0,25 μ l par minutes dans le cas d'injection de virus dilué, effectuée selon les mêmes conditions que dans l'exemple 4. Une injection 2 μ l à raison de 0,125 μ l/minute peut également être effectuée.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma :

A: +1 , V: + 2,3 , L: -5 ,

15 - Pour les souris (femelles adultes Nude ou Balb-C, 20-25g) : injection de 2 μ l à raison de 0,1 μ l par minute.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Lambda :

A: + 4,7 , L: + 1,7 , V: -3,6 ,

20 A deux jours et une semaine post-injection, la présence de cellules striatales exprimant la GFP a été détectée dans les deux espèces. Outre le striatum, d'autres cellules exprimant la GFP ont également été détectées dans le corps callum et dans l'épendyme (Figures 6 A, 6 B, 6C et Figure 7).

25 Le phénotypage immunohistochimique a permis de mettre en évidence une très grande majorité de cellules GFP/GFAP positive, suggérant un tropisme très préférentiellement glial de ce vecteur dans le cerveau.

Ces résultats démontrent donc de manière évidente la capacité du baculovirus à infecter des cellules neurales *in vivo*.

REVENDICATIONS

1. Baculovirus recombinant ou dérivé comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.
- 5 2. Baculovirus recombinant ou dérivé comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique et capable d'infecter et de diriger l'expression dudit produit thérapeutique dans les cellules du système nerveux de vertébrés, préférentiellement humaines.
- 10 3. Baculovirus selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
- 15 4. Baculovirus selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
- 20 5. Baculovirus selon la revendication 4, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et le TGF- β .
- 25 6. Baculovirus selon la revendication 4, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est le gène codant pour la β -glucuronidase.
7. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un baculovirus exprimant une protéine d'enveloppe autre que celle des baculovirus.

8. Baculovirus selon la revendication 7, caractérisé en ce que la protéine d'enveloppe est la glycoprotéine du virus de la rage ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).
9. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en 5 ce qu'il comprend également des séquences promotrices permettant l'expression de la séquence d'acides nucléiques hétérologue.
10. Baculovirus selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séquence promotrice est choisie parmi les promoteurs des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine 10 Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).
11. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend également des séquences signal permettant d'induire une sécrétion 15 ou une compartimentation spécifique du produit thérapeutique.
12. Utilisation d'un baculovirus recombinant ou dérivé comprenant dans son génome une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies du système nerveux.
- 20 13. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
14. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un 25 produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs

trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.

15. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5 et NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6 , la cardiotrophine , le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IFGF-2 , les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et le TGF- β .
16. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est impliqué dans les maladies lysosomiales et en particulier le gène codant pour la β -glucuronidase
17. Population de cellules du système nerveux (e.g. cerveau, moelle épinière, cellules neurales, gliales, épendymales, infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 11.
- 15 18. Implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 11.
19. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 11, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

1/8

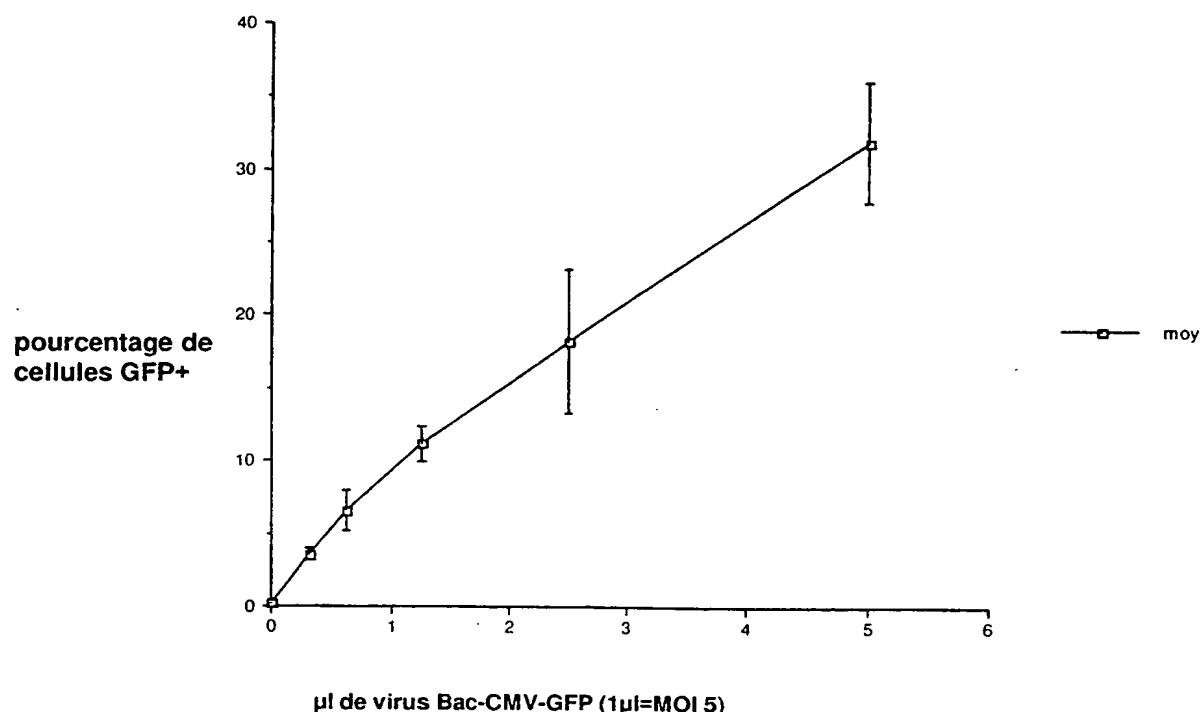


Figure 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/8

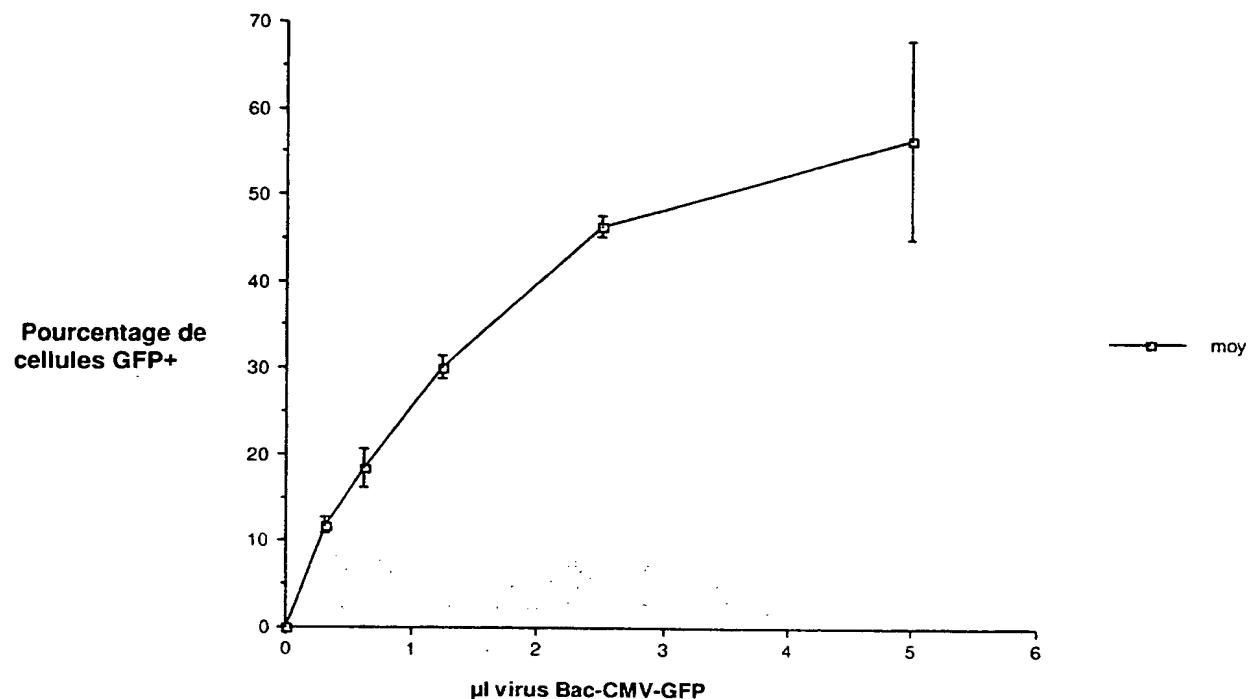


Figure 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

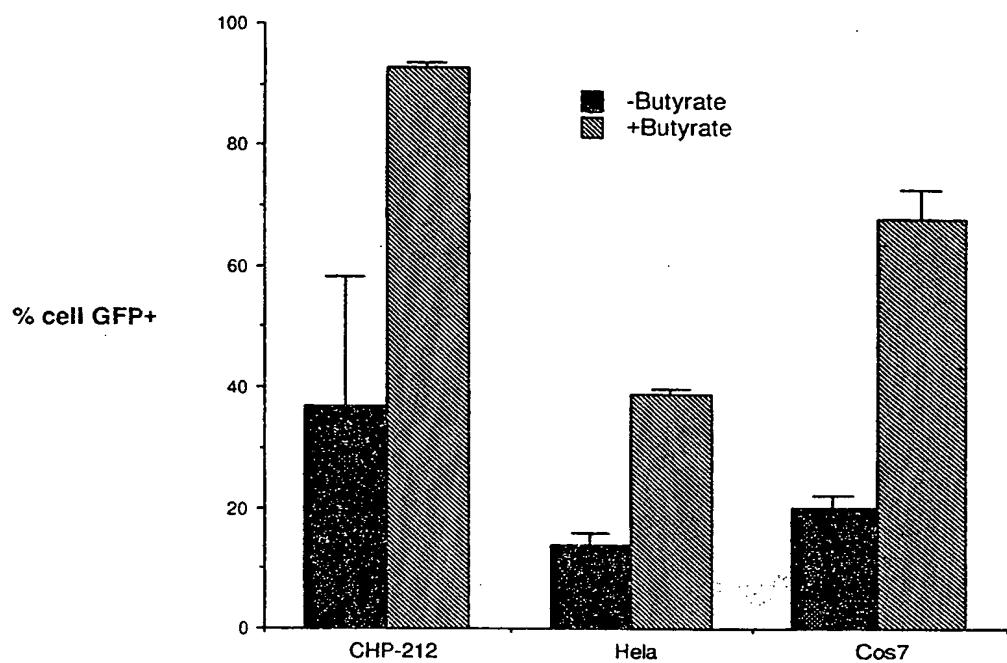


Figure 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/8

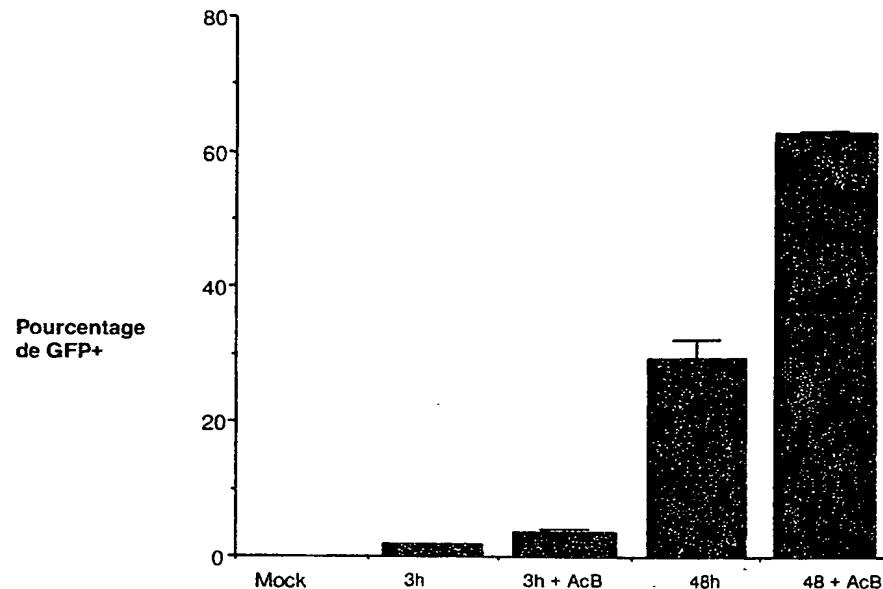


Figure 4 A

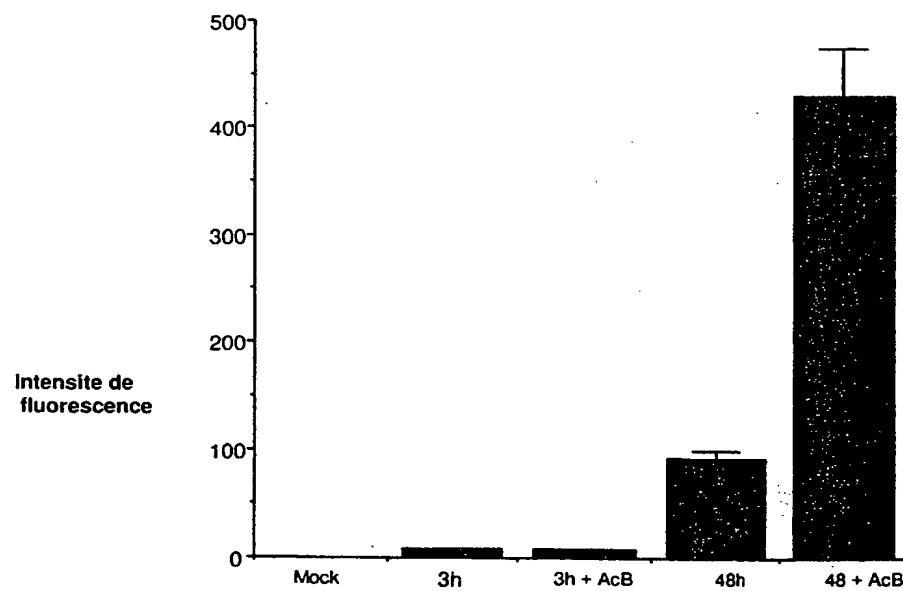


Figure 4B

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figure 5A

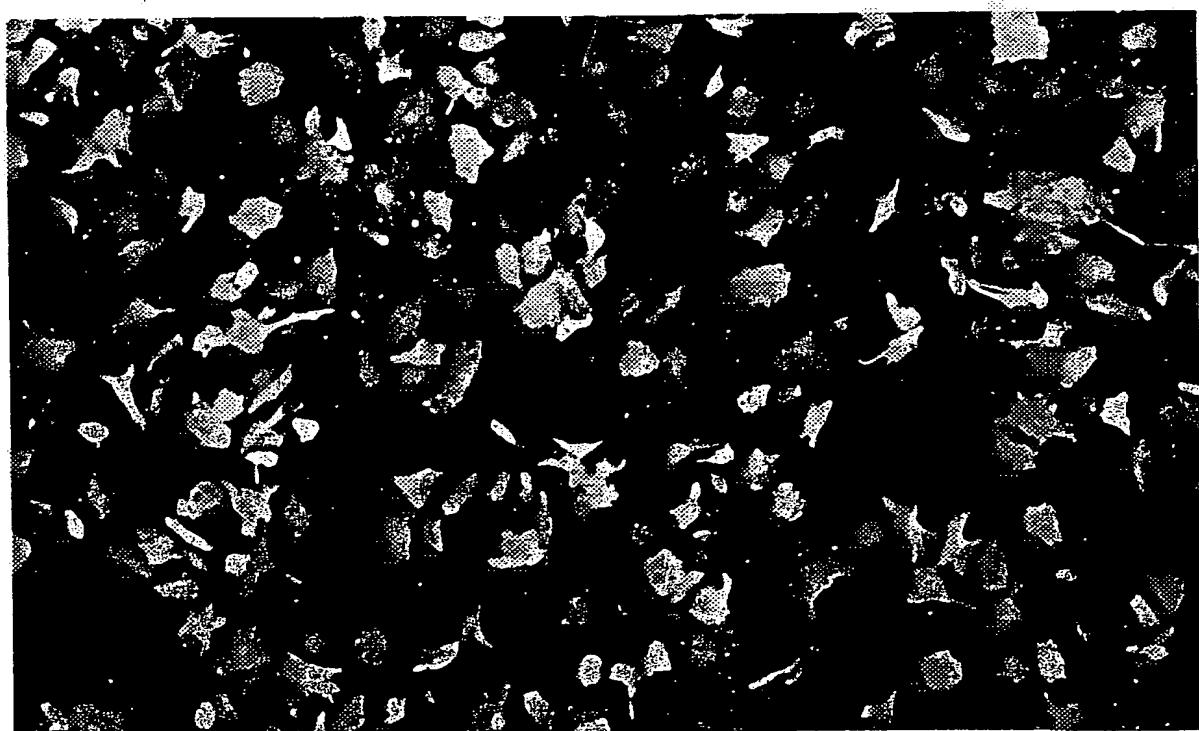


Figure 5B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/8

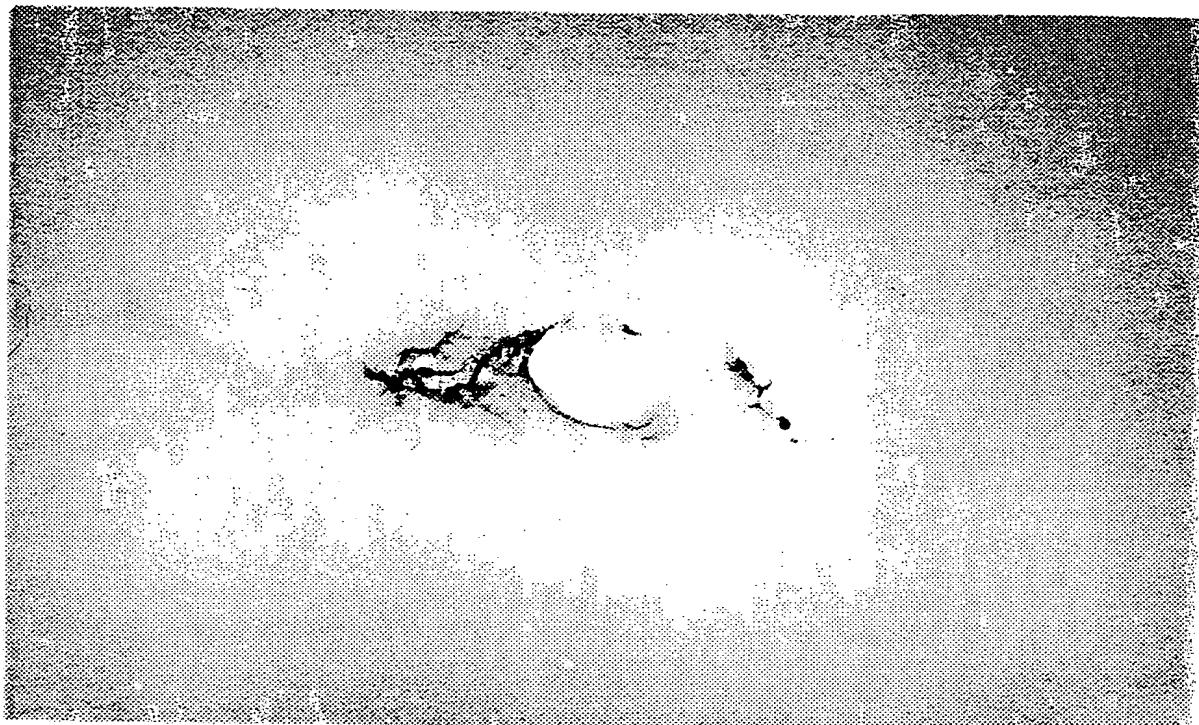


Figure 6A

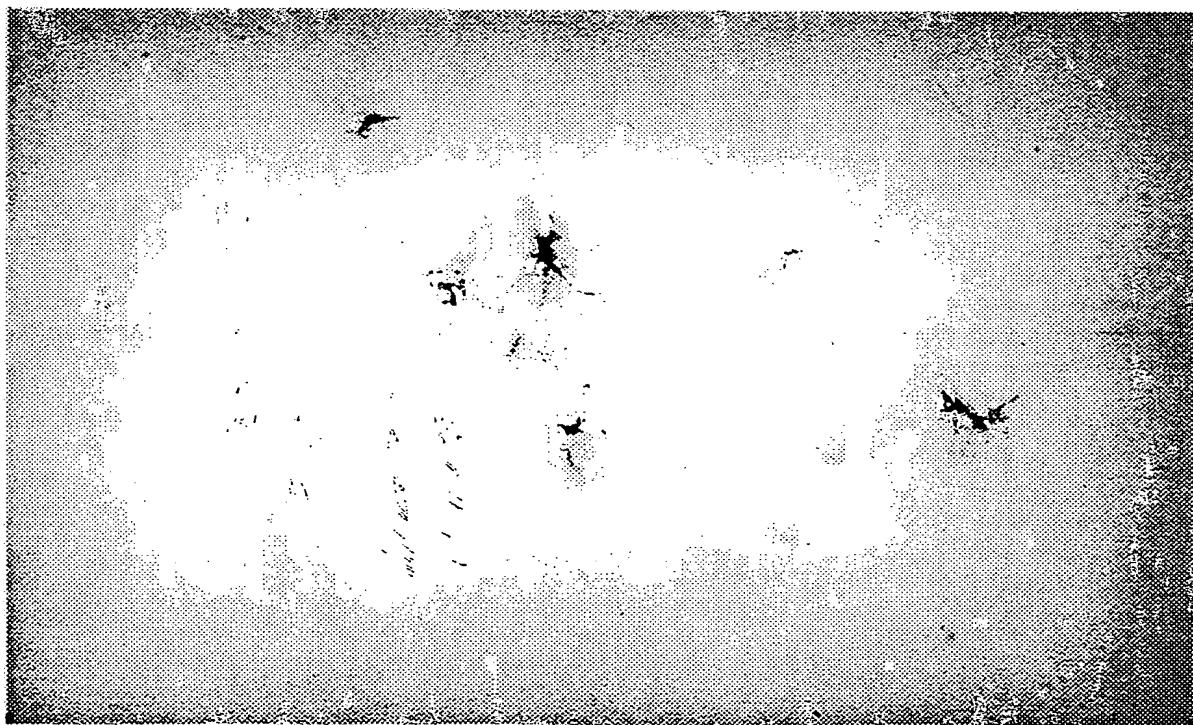


Figure 6B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/8



Figure 6C

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/8

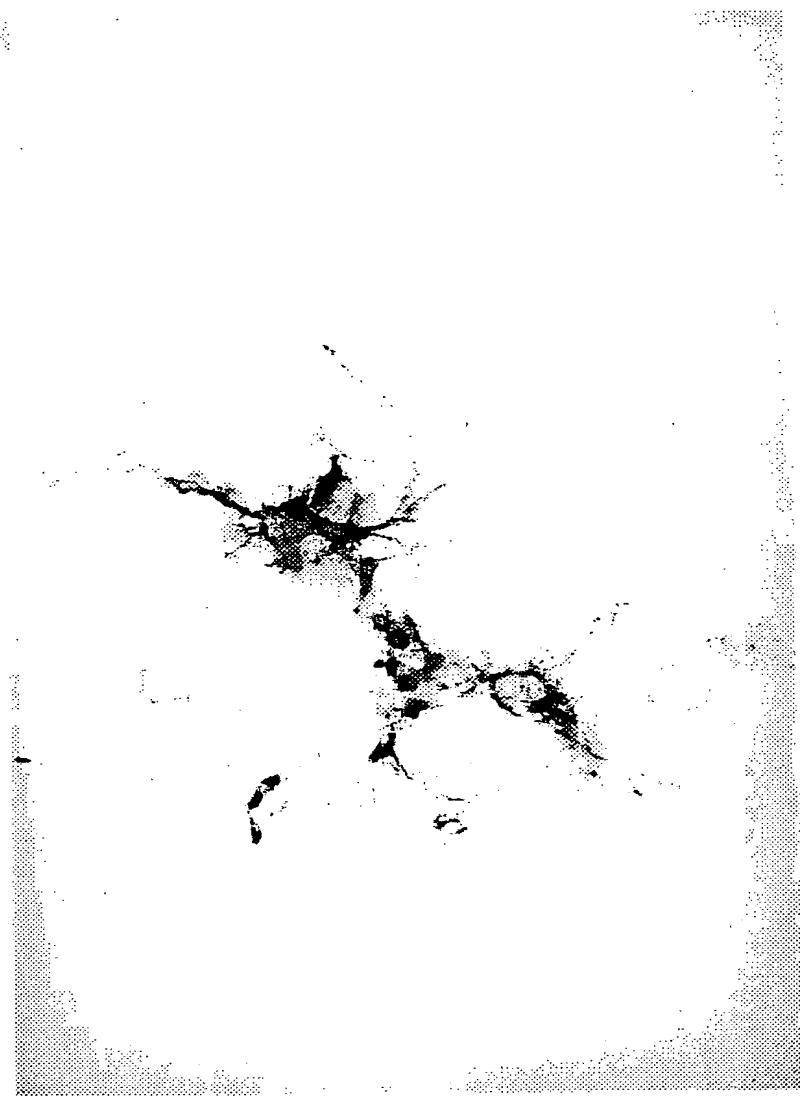


Figure 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/866 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 98 11243 A (BOYCE F M ; BARSOUM J G) 19 March 1998 (1998-03-19)</p> <p>page 5, line 5 - line 22; claim 16; table 3</p> <p>page 47, line 1 - line 6</p> <p>---</p>	1-5, 7-10, 12-15, 17, 198
X	<p>BOYCE FM AND BUCHER NLR: "Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, March 1996 (1996-03), pages 2348-2352, XP000783676 WASHINGTON US page 2349, left-hand column page 2352, last paragraph</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-3, 9, 11-13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

^a Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 1999

Date of mailing of the international search report

03/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01813

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SHOJI I ET AL.: "Efficient transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, no. 10, October 1997 (1997-10), pages 2657-2664, XP002100056 READING GB cited in the application figure 2</p> <p>-----</p>	1-3, 9, 11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatinal Application No

PCT/FR 99/01813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9811243 A	19-03-1998	AU 4340397 A	EP 0931159 A	02-04-1998 28-07-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/01813

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/866 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 11243 A (BOYCE F M ; BARSOUM J G) 19 mars 1998 (1998-03-19) page 5, ligne 5 - ligne 22; revendication 16; tableau 3 page 47, ligne 1 - ligne 6 ---	1-5, 7-10, 12-15, 17, 198
X	BOYCE FM AND BUCHER NLR: "Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, mars 1996 (1996-03), pages 2348-2352, XP000783676 WASHINGTON US page 2349, colonne de gauche page 2352, dernier alinéa --- -/-	1-3, 9, 11-13

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cupido, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01813

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SHOJI I ET AL.: "Efficient transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, no. 10, octobre 1997 (1997-10), pages 2657-2664, XP002100056 READING GB cité dans la demande figure 2</p> <p>-----</p>	1-3, 9, 11-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Ref. Internationale No

PCT/FR 99/01813

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9811243 A	19-03-1998	AU	4340397 A	02-04-1998
		EP	0931159 A	28-07-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)